

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-306201

(43)Date of publication of application : 21.11.1995

(51)Int.Cl.

G01N 33/50

(21)Application number : 06-123092

(71)Applicant :

NIPPON ELECTRIC GLASS CO LTD

(22)Date of filing : 11.05.1994

(72)Inventor :

YAMADA SHIGERU
NAKAMURA TAKASHI
KOKUBO TADASHI
SHIBUYA TAKEHIRO

(54) PRODUCTION OF SUBSTRATE FOR EVALUATING OSTEOCLAST

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce a substrate for evaluating an osteoclast in which the absorption fossa, formed through activity of an osteoclast, can be determined easily.

CONSTITUTION: A glass or a crystallized glass principally comprising CaO and SiO₂, a glass principally comprising Na₂O and SiO₂, or a calcium phosphate- based ceramic is prepared as a basic material which is then immersed into a solution containing calcium ions and phosphorus ions thus obtaining a substrate for evaluating osteoclast with an apatite film being formed on the surface thereof.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

THIS PAGE BLANK (USFTO)

Japanese Publication for Unexamined Patent
Application No. 306201/1995 (*Tokukaihei* 07-306201)

A. Relevance of the Above-identified Document

This document has relevance to all claims of the present application.

B. Translation of the Relevant Passages of the Document

See the attached English Abstract.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-306201

(43) 公開日 平成7年(1995)11月21日

(51) Int.Cl.⁶
G 0 1 N 33/50

識別記号 庁内整理番号
X

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数1 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平6-123092

(22) 出願日 平成6年(1994)5月11日

(71) 出願人 000232243

日本電気硝子株式会社

滋賀県大津市晴嵐2丁目7番1号

(72) 発明者 山田 茂

滋賀県大津市比叡平3丁目27-22

(72) 発明者 中村 孝志

京都府京都市右京区西院春栄町36-13

(72) 発明者 小久保 正

京都府長岡京市梅が丘2丁目50番地

(72) 発明者 渋谷 武宏

滋賀県大津市晴嵐2丁目7番1号 日本電気硝子株式会社内

(54) 【発明の名称】 破骨細胞評価用基板の製造方法

(57) 【要約】

【目的】 破骨細胞の活動により形成される吸収窩が確認し易い破骨細胞評価用基板を製造する方法を提供する。

【構成】 まずCaOとSiO₂を主成分とするガラス若しくは結晶化ガラス、Na₂OとSiO₂を主成分とするガラス、又はリン酸カルシウム系セラミックスからなる基材を用意する。次いでこの基材をカルシウムイオンとリン酸イオンを含む溶液中に浸漬することにより、基材表面にアパタイト膜が形成された破骨細胞評価用基板を得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 CaO と SiO_2 を主成分とするガラス若しくは結晶化ガラス、 Na_2O と SiO_2 を主成分とするガラス、又はリン酸カルシウム系セラミックスからなる基材を、カルシウムイオンとリン酸イオンを含む溶液中に浸漬して、基材表面にアパタイト膜を形成することを特徴とする破骨細胞評価用基板の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は破骨細胞の活性度を評価するために用いられる破骨細胞評価用基板の製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】骨組織は骨形成と骨吸収が絶えず行われ、古い骨が吸収された後に新しい骨が形成される過程が繰り返される。この活動のうち骨吸収は破骨細胞が担っているが、様々な疾患により破骨細胞の働きに障害が生じると骨代謝異常が起こることが知られている。このため破骨細胞の働きを評価することが重要となっている。例えば骨量が低下し、骨折を起こし易くなる骨粗しょう症では、破骨細胞の活動を抑える治療薬が開発されているが、このような薬の効果を評価する場合には破骨細胞の機能評価が不可欠である。

【0003】ところで破骨細胞は、プロトンイオン(H^+)を分泌することによって局所のpHを低下させ、骨の成分であるアパタイトを溶解して吸収する。このためその機能評価は、牛骨や鯨デンティン等の生物試料上で破骨細胞を培養し、破骨細胞の活動による吸収窩が形成されているか否かや破骨細胞の大きさ等を評価することが行われている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら牛骨には骨細胞が存在していたり血管による穴があるため、破骨細胞による吸収窩が評価し難い。また鯨デンティンは、骨細胞や血管による穴がなく、スムーズな表面を有しているため評価には適しているが、資源保護の問題から入手が困難になっている。

【0005】そこで生物試料の代わりに人工的に評価用基板を作製する試みがなされており、例えば水酸アパタイト焼結体を評価用基板として用いることがバイオマテリアル1993年、Vol. 14, No. 2において提案されている。しかし水酸アパタイト焼結体は破骨細胞に吸収され難く、しかも焼結時の気孔や研磨による傷や穴により、吸収窩が確認し難いという欠点を有している。

【0006】本発明の目的は、破骨細胞の活動により形成される吸収窩が確認し易い破骨細胞評価用基板を製造する方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明の破骨細胞評価用

基板の製造方法は、 CaO と SiO_2 を主成分とするガラス若しくは結晶化ガラス、 Na_2O と SiO_2 を主成分とするガラス、又はリン酸カルシウム系セラミックスからなる基材を、カルシウムイオンとリン酸イオンを含む溶液中に浸漬して、基材表面にアパタイト膜を形成することを特徴とする。

【0008】以下、本発明の製造方法を詳細に説明する。

【0009】まず CaO と SiO_2 を主成分とするガラス若しくは結晶化ガラス、 Na_2O と SiO_2 を主成分とするガラス、又はリン酸カルシウム系セラミックスからなる基材を用意する。

【0010】 CaO と SiO_2 を主成分とするガラスとしては、重量百分率で CaO 20～60%、 SiO_2 30～60%、 P_2O_5 0～30%、 MgO 0～20%、 CaF_2 0～5%からなるものや、 CaO 20～30%、 SiO_2 20～60%、 Na_2O 20～60%からなるもの等が使用できる。また CaO と SiO_2 を主成分とする結晶化ガラスとしては重量百分率で CaO 20～60%、 SiO_2 30～60%、 P_2O_5 0～30%、 MgO 0～20%、 CaF_2 0～5%からなり、アパタイトとウォラストナイト、さらに必要に応じてデオブサイドや第三リン酸カルシウム等を析出してなるもの等を使用することができる。

【0011】 Na_2O と SiO_2 を主成分とするガラスとしては、 Na_2O 20～40%、 SiO_2 60～80%、 CaO 0～20%、 MgO 0～10%の組成を有するもの等が使用できる。

【0012】リン酸カルシウム系セラミックスとしては水酸アパタイト焼結体、リン酸水素カルシウム焼結体等が好ましい。

【0013】なお基材をこれらの材料に限定した理由は細胞培養に悪影響を与えないとともに、カルシウムイオン及びリン酸イオンを含む水溶液に浸漬するだけで緻密で平坦なアパタイト膜を基材表面に形成することができるためである。

【0014】次に基材をカルシウムイオンとリン酸イオンを含む溶液中に浸漬する。

【0015】カルシウムイオンとリン酸イオンを含む溶液は特に限定されるものではないが、イオン濃度が高すぎると溶液が不安定になって結晶が析出してしまうことがあるため、カルシウムイオンは Ca^{2+} として10mM以下、リン酸イオンは HPO_4^{2-} として50mM以下であることが好ましい。またトリスヒドロキシメチルアミノメタン50mMや塩酸45mMを加えてpHを6～9、好ましくは7.25に調整しておくことが望ましい。なお溶液の好適な例は、人体液と同じ程度の無機イオン濃度を有し、且つ、同程度のpHを有するいわゆる疑似体液である。表1に疑似体液を示す。これらの中でも特に好ましいのはNo. 3の溶液である。

【0016】

* * 【表1】

(mM)

	人体液	1	2	3	4
Na ⁺	142.5	150.0	132.0	142.0	—
K ⁺	5.0	0.5	3.0	5.0	—
Ca ²⁺	2.5	1.5	5.0	2.5	0.6
Mg ²⁺	1.5	0.5	1.0	1.5	1.0
HCO ₃ ⁻	27.0	2.0	1.0	4.2	3.2
Cl ⁻	103.0	103.0	132.2	147.8	157.0
HPO ₄ ²⁻	1.0	0.5	0.3	1.0	0.6
SO ₄ ²⁻	0.5	0.1	0.2	0.5	1.0
プロテイン	16.0	—	—	—	—

【0017】溶液の温度は形成されるアパタイト膜の膜厚や性状に影響し、温度が高いほどアパタイト膜の成長が早くなる傾向がある。溶液の温度としては10～70℃程度であれば使用可能であるが、30～45℃、特に36～37℃であることが好ましい。

【0018】基材の溶液への漬浸時間は、基材の種類、溶液の種類や温度等によって左右されるが、例えば36～37℃の擬似体液を使用した場合、1時間～7日間である。

【0019】このようにして基材をカルシウムイオン及びリン酸イオンを含む溶液中に漬浸することにより、基材表面に水酸アパタイトや炭酸アパタイトからなる平坦で緻密なアパタイト膜が形成された破骨細胞評価用基板を得ることができる。なおアパタイト膜の膜厚は特に限定されるものではないが、1～10μmが観察し易く好ましい。

【0020】

【作用】本発明の破骨細胞評価用基板の製造方法において、CaOとSiO₂を主成分とするガラス若しくは結晶化ガラスからなる基材をカルシウムイオンとリン酸イオンを含む溶液に漬浸すると、基材表面からカルシウムイオンが溶出して溶液中のカルシウムイオン濃度を高め、アパタイトを析出し易くする。また基材表面にシラノール基が形成され、これがアパタイトの核の生成を著しく誘起して基材表面にアパタイトの核を無数に生成させる。そして生成した核が水溶液中のカルシウムイオン

やリン酸イオンを取り込んで成長し、基材表面にアパタイト膜が形成される。

【0021】Na₂OとSiO₂を主成分とするガラスからなる基材を溶液に漬浸すると、ナトリウムイオンが溶出して溶液中のアパタイトの成分であるOH基濃度が高まり、アパタイトの析出が容易になる。また基材表面に多くのシラノール基が形成され、これがアパタイトの核の生成を著しく誘起するため、上記と同様に基材表面にアパタイト膜が形成される。

【0022】またリン酸カルシウム系セラミックスからなる基材を用いた場合は、基材表面からカルシウムイオンが溶出して溶液中のカルシウムイオン濃度を高め、基材表面付近のアパタイトの過飽和度が高くなる。その結果、基材表面にアパタイトが析出し、アパタイト膜が形成される。

【0023】このようにして形成されたアパタイト膜は緻密で平坦であるとともに、骨類似のアパタイトからなるため破骨細胞に吸収され易いものである。

【0024】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明を説明する。

【0025】表2及び表3は本発明の実施例（試料No. 1～4）及び比較例（試料No. 5及び6）を示している。

【0026】

【表2】

試料No.		1	2	3
基 材		CaO-SiO ₂ -P ₂ O ₅ -MgO系ガラス	CaO-SiO ₂ -P ₂ O ₅ -MgO系ガラス	Na ₂ O-SiO ₂ -CaO系ガラス
アパタイト膜の有無		有	有	有
吸収窩の評価	(10時間後) 吸収窩形成の有無	有	有	有
	評価の難易度	容 易	容 易	容 易
	(24時間後) 吸収窩形成の有無	有	有	有
	評価の難易度	容 易	容 易	容 易

【0027】

* * 【表3】

試料No.		4	5	6
基 材		水酸アパタイト焼結体	牛 骨	水酸アパタイト焼結体
アパタイト膜の有無		有	無	無
吸収窩の評価	(10時間後) 吸収窩形成の有無	有	無	無
	評価の難易度	容 易	—	—
	(24時間後) 吸収窩形成の有無	有	有	無
	評価の難易度	容 易	やや困難	—

【0028】試料No. 1~4は次のようにして調製した。

【0029】まず表に示した材料からなる大きさ15φ×1tmmの基材を用意した。また基材を漬浸する溶液として、表1のNo. 3の擬似体液を使用し、これにトリスヒドロキシメチルアミノメタン50mMや塩酸45mMを加えて36.5℃でのpHを7.25に調節した。その後、ポリエチレン容器に基材と溶液30mlを入れ、液温を37℃に保持して5日間漬浸することにより、基材表面に緻密で平坦な膜厚2~3μmのアパタイト膜を形成した。このアパタイト膜は、水酸アパタイトと炭酸アパタイトが混在した骨類似のアパタイトからなる膜であった。なおアパタイト膜が形成されたか否か、或は形成されたアパタイト膜の状態等については、基材を溶液から取り出し、蒸留水で洗浄乾燥させた後、走査型顕微鏡と薄膜X線回折分析により確認した。

【0030】試料No. 5は、牛骨から作製した6φ×0.2tmmの基材を使用し、また試料No. 6は、試料No. 4で基材として用意した水酸アパタイト焼結体を用いた。

【0031】次に、各試料を12穴の培養プレートに入れて、2×10⁷個の破骨細胞を播種し、10%牛胎児血清を含むα-MEM培養液1mlで培養した。その後、培養開始10時間後及び24時間後に0.001%ブロナーゼEと0.02%EDTA液で破骨細胞以外の

細胞を取り除き、続いて走査電子顕微鏡、位相差顕微鏡及び倒立顕微鏡を用い、破骨細胞の活動によって形成された吸収窩を観察した。なお倒立顕微鏡による観察に際しては、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼにて細胞を染色した。

【0032】結果を表2及び表3に示す。アパタイト膜が形成された試料No. 1~4の各試料では、培養開始10時間後で破骨細胞の吸収窩が形成され、しかも明瞭に観察できた。これに対して牛骨を用いた試料No. 5は、12時間経過後では未だ吸収窩が形成されておらず、24時間経過後は吸収窩が形成されていたものの、その確認はやや困難であった。また水酸アパタイト焼結体を用いた試料No. 6は、24時間経過後でも吸収窩が全く形成されなかった。

【0033】なお基材として使用したCaO-SiO₂-MgO-P₂O₅系ガラスは、重量百分率でCaO44.7%、SiO₂34%、MgO4.6%、P₂O₅16.2%、CaF₂0.5%の組成を有するものである。CaO-SiO₂-MgO-P₂O₅系結晶化ガラスは、上記組成のガラスを1050℃で2時間焼成してアパタイトとウォラストナイトを析出させたものである。Na₂O-SiO₂-CaO系ガラスは、Na₂O20%、SiO₂70%、CaO10%の組成を有するものを使用した。水酸アパタイト焼結体は、水酸アパタイト粉末を2000kgf/cm²の静水圧プレス成形

後、1000℃で2時間焼成したものを用了。

【0034】また破骨細胞は公知の方法で用意した。即ち、日本白色ラビット10日齡の長官骨を切り出し、細かく粉碎し、続いて30mlの α -MEM培養液に漬浸して細胞抽出のため1分間振動させた後、静置して20mlの上澄み液を採取した。さらに細胞を遠心分離し、40mlの α -MEM培養液と10%の牛胎児血清と抗生物質（ペニシリンG100U/mlとストレプトマイシン100 μ g/ml）に懸濁させ、破骨細胞含有分画

とした。このようにして得られた破骨細胞をを使用した。

【0035】

【発明の効果】本発明の方法によって製造された破骨細胞評価用基板は、形成されるアパタイト膜が骨類似のアパタイトからなるために破骨細胞による吸収窩が形成され易く、またアパタイト膜が緻密で平坦であるため形成された吸収窩が観察し易い。このため破骨細胞の機能評価が容易であり、破骨細胞評価用基板の製造方法として好適である。

THIS PAGE BLANK (USPTO)